

VARIAN GENETIK *Sardinella lemuru* DI PERAIRAN SELAT BALI

GENETIC VARIANCE OF *Sardinella lemuru* IN THE BALI STRAIT WATERS

Gde Raka Angga Kartika^{1*}, Aida Sartimbul², Widodo³

¹Fakultas Kelautan dan Perikanan Universitas Udayana, Bali

²Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya, Malang

³Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang

*Corresponding author email: raka.angga.k@gmail.com

Submitted: 1 Agustus 2016 / Revised: 24 Maret 2017 / Accepted: 25 April 2017

<http://doi.org/10.21107/jk.v10i1.1615>

ABSTRACT

Sardinella lemuru is one of the fish species that dominate in the Bali Strait. Identification *Sardinella lemuru* with the others *Sardinella* in the Strait of Bali is based on morphological characteristics, whereas genetic identification of *Sardinella lemuru* in Bali Strait has not been done and variations genetic also unknown. This research aims to ascertain the type of *Sardinella lemuru* in the Bali Strait and Determine genetic variation and kinship based on cytochrome oxidase subunit (COI) gene. The method is performed by isolating DNA from fish organs and the results are amplified by the COI gene sequencing then performed to obtain the data sequence of *Sardinella lemuru* Bali Strait and analysed using the program MEGA 5.2. Results showed that *lemuru* in Bali Strait is *Sardinella lemuru* species with the degree of similarity BLAST analysis of 98-100%. 11 samples sequence of *lemuru* forming two large clad. The results also showed that the species of *Sardinella lemuru* and *Sardinella longiceps* different species with genetic distance > 0,019.

Keywords: COI, *Sardinella lemuru*, Bali Straits

ABSTRAK

Sardinella lemuru merupakan salah satu spesies ikan yang mendominasi di perairan Selat Bali. Identifikasi *Sardinella lemuru* dengan *sardinella* lain di perairan Selat Bali hanya dibedakan berdasarkan secara morfologi, sedangkan identifikasi genetik belum pernah dilakukan dan variasi genetik juga belum diketahui. Penelitian ini bertujuan memastikan jenis *Sardinella lemuru* di perairan Selat Bali dan mengetahui variasi genetik dan kekerabatannya berdasarkan gen Cythochrome oxidase sub unit 1 (COI). Metode yang dilakukan adalah dengan mengisolasi DNA dari organ tubuh ikan *lemuru* dan hasilnya di amplifikasi dengan gen COI, kemudian dilakukan skuensing dianalisis menggunakan program MEGA 5.2. Hasil menunjukkan bahwa ikan *lemuru* di Selat Bali termasuk kedalam spesies *Sardinella lemuru* dengan tingkat kesamaan analisis BLAST adalah sebesar 98-100%. 11 sampel skuens ikan *lemuru* membentuk 2 kelompok besar. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa spesies *Sardinella lemuru* dan *Sardinella longiceps* merupakan spesies ikan yang berbeda dengan jarak genetik >0,019

Kata Kunci: COI, *Sardinella lemuru*, Selat Bali

PENDAHULUAN

Perairan Selat Bali merupakan wilayah perairan yang memisahkan antara Pulau Jawa dan Bali. Perairan ini memiliki potensi perikanan yang sangat besar dan keunikan

tersendiri. Beberapa komoditas perikanan yang sering dijumpai di Selat Bali adalah ikan *lemuru* (*Sardinella lemuru*), tongkol dan ikan layang. Sumberdaya perikanan *lemuru* merupakan sumberdaya perikanan yang paling dominan dan bernilai ekonomis di

Selat Bali sehingga komoditi tersebut paling banyak dieksploitasi oleh nelayan yang bermukim di sekitar Selat Bali. Hal ini yang menyebabkan perikanan lemuru mempunyai peranan yang cukup penting bagi kehidupan masyarakat setempat.

Nilai penting komoditas perikanan lemuru di selat bali dapat dilihat dari data tangkapan ikan yang didominasi oleh jenis ikan lemuru. Berdasarkan data pendaratan ikan lemuru di PPI Muncar selama 10 tahun terakhir terlihat bahwa puncak produksi terjadi pada tahun 2006 dan 2007 yang mencapai lebih dari 50.000 ton. Namun dalam kurun beberapa tahun terakhir produksi perikanan lemuru mengalami penurunan yang signifikan. Penurunan ini diduga terkait dengan perubahan kondisi lingkungan dan penangkapan yang sudah sangat berlebihan (Susilo, 2015). Penangkapan yang berlebih dengan menggunakan armada purse seine pada komoditas ikan lemuru di selat bali dapat mengancam kelestarian sumberdaya ikan itu sendiri yang pada giliran berikutnya menyebabkan turunnya produksi atau bahkan kepunahan.

Pengetahuan tentang aspek biologi dan ekologi ikan lemuru sangat diperlukan dalam pengelolaan pelestarian sumberdaya ikan lemuru. Selama ini pengelolaan sumberdaya ikan lemuru pada umumnya hanya ditekankan pada pengertian yang sempit yaitu kelimpahan dan ukuran ikan yang akan ditangkap. Akibat dari fokus jangka pendek tersebut, maka perspektif biologi dari pengelolaan sumberdaya ikan lemuru lebih didominasi oleh pengetahuan tentang dinamika populasi dan ekologi dibandingkan dengan pemahaman tentang aspek genetika populasi (Noor, 2008). Aspek genetika ikan merupakan salah satu bagian terpenting dalam mengetahui kekerabatan dan varian genetic suatu populasi ikan di suatu daerah. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk mengetahui varian genetic dan kekerabatan pada hewan adalah menggunakan gen penyandi yaitu gen cytochrome oxidase sub unit I (COI)

Gen cytochrome oxidase sub unit I (COI) merupakan salah satu gen dalam mitokondria yang dapat digunakan dalam studi karakter genetic maupun filogeni dari hewan. Ukuran dan struktur dari gen cytochrome oxidase subunit 1 (COI) telah menjadi fokus pada

analisis kelompok hewan dan studi evolusi sebagaimana diperlihatkan pada studi karakter genetic maupun pola-pola evolusi pada hewan (Tubaro dan Lijtmaer, 2002). Gen COI merupakan salah satu region target dalam teknik DNA Barcoding karena dinilai efektif untuk digunakan sebagai diskriminan kelompok hewan (Costa *et al.*, 2007). Penggunaan gen COI untuk membedakan species sudah dilakukan pada beberapa jenis species hewan contohnya pada udang mantis, kerang, ulat sutra, serangga, sapi dan beberapa jenis species ikan. Menurut Buhay (2009) bahwa COI merupakan salah satu metode yang sangat membantu untuk mengidentifikasi kekerabatan pada species hewan dan ikan. Herbert *et al.* (2003), juga menyatakan bahwa Gen COI dapat membantu sistem biidentifikasi pada berbagai jenis hewan dan mampu memberikan jawaban terhadap kekerabatan dalam species mencapai 100 %. Divya *et al.*, (2009).

Penurunan jumlah populasi ikan lemuru dapat menyebabkan variasi genetic akan berubah pada masa selanjutnya. Kecilnya populasi ikan lemuru yang tersisa akan mengarah terjadinya silang dalam yang berakibat kepada perubahan keragaman genetic. Dunham (2002) menjelaskan bahwa variasi genetic penting untuk kelangsungan hidup jangka panjang suatu species dan juga dapat menjamin kekuatan suatu species atau populasi dengan memberikan species atau populasi tersebut kemampuan untuk beradaptasi pada perubahan lingkungan. Sampai saat ini publikasi tentang studi kekerabatan dalam species *Sardinella lemuru* di Selat Bali masih sangat sedikit, bahkan dengan metode COI belum pernah dilaporkan, sehingga perlunya mengetahui varian genetic *Sardinella lemuru* di Selat Bali sebagai data base untuk berbagai kepentingan seperti manajemen penangkapan ikan lemuru di perairan Selat Bali dan berbagai kepentingan lain.

MATERI DAN METODE

Pengambilan sampel ikan lemuru dilakukan di Pelabuhan Perikanan Muncar Banyuwangi, Jawa Timur dan Tempat Pendaratan Ikan Kedongan Badung, Bali. Analisis DNA berdasarkan gen Cytochrome Oxidase Sub Unit I dilakukan di Laboratorium

Biomolekuler Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang.

Bahan - bahan yang digunakan dalam ekstraksi DNA adalah sebagai berikut: akuadest steril, larutan lysis buffer, ammonium acetate, ETOH 100%, Etanol 70 %, larutan buffer TE. Metode ekstraksi DNA yang dilakukan mengacu pada metode yang diterapkan oleh Ausubel *et al*, (2002). Pada penelitian ini menggunakan primer forward (5'- TCAACCAACCACAAAGACGACATTG GCAC -3') sebagai primer pertama dan primer reverse (5'- TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATC A -3') (Jonas, 2011). Amplifikasi dilakukan menggunakan sekuen gen dengan panjang 650 base pair dari COI Fragment. Volume total Mixture PCR : 5 μ l terdiri dari : Aquabidest : 2 μ l, Primer I : 5'- TCAACCAACCACAAAGACGACATTG GCAC -3' 1 μ l, Primer II : 5'- TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATC A -3' 1 μ l, Master mix: 5 μ l, Sampel DNA : 1 μ l. Proses amplifikasi PCR adalah denaturasi pada suhu 94° C selama 1 menit, annealing pada suhu 54° C selama 30 detik dan pemanjangan pada suhu 72° C selama 1 menit dengan jumlah siklus adalah 35 siklus. Pemanjangan terakhir dilakukan pada suhu 72° C selama 10 menit. Verifikasi hasil dari analisa PCR dilakukan dengan running electrophoresis menggunakan gel agarose 1,5%. Hasil dari electrophoresis kemudian diamati dengan UV - transiluminator dan difoto sebagai dokumentasi

Hasil dari PCR (band pada gel agarose) harus dimurnikan dengan menghilangkan protein

dan kontaminan lainnya. Hasil PCR dicampur dengan etanol absolute dan NaAcin pada tabung PCR, kemudian dicampur dan di inkubasi pada suhu 20° C selama 30 menit. Larutan ini disentrifuse dengan kecepatan maksimum selama 5 menit lalu supernatan dibuang. 750 ul etanol 70% ditambahkan ke dalam butiran DNA, setelah itu disentrifuse pada kecepatan maksimum selama 3 menit, dan butiran dilarutkan dengan 50ul ddH₂O.

Urutan basa dari hasil skuensing DNA diperiksa dengan menggunakan gene scane ABI. Urutan dicek kebenarannya berdasarkan kemiripan dengan COI dari genus *Sardinella* di gen bank dengan menggunakan metode BLAST. Software Mega 5.2 digunakan untuk mengetahui indeks kemiripan di antara sampel. Kemiripan berdasarkan panjang DNA mengikuti metode dari (Nei dan Kumar, 2000) , yang diperoleh dengan membagi jumlah perbedaan nukleotida dengan jumlah total nukleotida pembanding.

Basa nukleotida hasil sekuensing kemudian dibandingkan dengan skuen Gen *Sardinella lemuru* dan *Sardinella longiceps* dari daerah lain. Sekuen gen COI yang digunakan sebagai pembanding diperoleh dari gen bank NCBI (Tabel 1). Pohon filogenetik akan dibangun menggunakan software Mega 5.2 berdasarkan jarak DNA dari analisa sebelumnya. Rekonstruksi dari sejarah evolusi gen dan spesies merupakan salah satu hal terpenting dalam evolusi molekuler. Data ini sangat penting untuk memahami mekanisme evolusi dari satu spesies (Nei and Kumar, 2000).

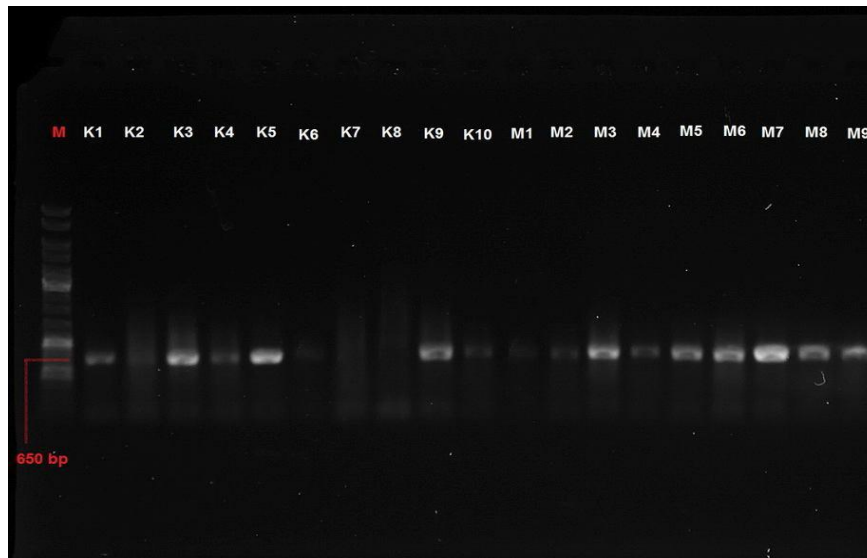
Tabel 1. Sekuen gen COI *Sardinella lemuru* dan *Sardinella longiceps* dari Gen Bank

NO	Lokasi	Gen Bank Acc numb
1	Laut China Selatan (MBCSC-2711073)	EU5955255.1
2	Laut China Selatan (MBCSC-2711073)	EU5955256.1
3	China (FSCS327-06)	EF607505.1
4	China (FSCS328-06)	EF607504.1
5	Filipina (2)	HQ231366.1
6	Filipina (3)	HQ231365.1
7	Filipina (4)	HQ231364.1
8	Selat Taiwan (1)	KX2544.86.1
9	Selat Taiwan (1)	KX2544.86.1
10	<i>S. longiceps</i> (COML-111)	KF36899.1
11	<i>S. longiceps</i> (IOBML)	FJ384694

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keragaman genetik *Sardinella lemuru* dikaji berdasarkan gen cytochrome oksidase 1 (COI). Gen ini dipilih karena fragmen pendek COI dapat digunakan sebagai penanda variasi yang secara akurat dapat mengidentifikasi berbagai macam hewan sampai tingkat spesies (Hebert, 2003). Gen COI juga sangat tepat untuk mengetahui keragaman genetik yang terdapat pada suatu spesies atau antar populasi. Panjang gen COI yang berhasil teramplifikasi adalah ± 650 bp (base pair), ini dibuktikan dengan uji kualitatif menggunakan elektroforesis gel agarose (Gambar 1). Dari hasil elektroforesis, 20 sampel ikan lemuru hanya didapatkan 15

sampel yang tampak terlihat jelas pita DNANYA. Hasil sekuensing dapat terbaca dengan baik berkisar antara 650 bp. Hasil analisis dengan fasilitas BLAST menunjukkan bahwa ikan lemuru yang diperoleh di Muncar, Banyuwangi dan Kedonganan, Badung dikonfirmasi sebagai spesies *Sardinella lemuru*. Panjang ampikon gen COI yang di dapat pada penelitian hampir sama dengan panjang gen ampikon *Sardinella lemuru* yang terdapat pada Gen Bank yaitu sebesar 652 bp. (Zhang, 2011). Beberapa hasil amplifikasi terlihat tidak jelas atau samar, hasil yang samar dapat ini disebabkan oleh konsentrasi DNA yang terkandung rendah atau masih terkontaminasi dengan RNA dan protein.



Gambar 1. Hasil Amplifikasi Gen COI *Sardinella Lemuru* Pada Gel Agarosa 1,5%

Mutasi gen merupakan faktor yang menyebabkan timbulnya keanekaragaman genetik yang berakibat pada timbulnya keanekaragaman dalam kehidupan. Dilihat dari sudut penyebabnya, mutasi dikelompokkan menjadi dua jenis yaitu mutasi spontan dan mutasi terimbas. Mutasi spontan merupakan mutasi yang terjadi pada kondisi alami selama proses replikasi, perbaikan, dan rekombinasi DNA. Mutasi terimbas adalah mutasi yang disebabkan oleh agen-agen lingkungan spesifik (Sofro 1994). Mutasi substitusi merupakan jenis mutasi gen dimana basa nukleotida berubah

menjadi bentuk basa lain dalam urutan DNA yang dapat menyebabkan terjadinya evolusi. Mutasi substitusi dibagi ke dalam dua jenis yaitu transisi dan tranversi. Transisi adalah perubahan antara A dan G (purin) atau antara C dan T (pirimidin) (Wijana dan Mahardika, 2010) Tranversi adalah perubahan antara purin dengan pirimidin. Substitusi transisi ditunjukkan oleh angka yang bercetak tebal sedangkan substitusi tranversi ditunjukkan oleh angka yang bercetak miring (Tabel 2) Mutasi inilah yang menyebabkan variasi genetik pada suatu organisme.

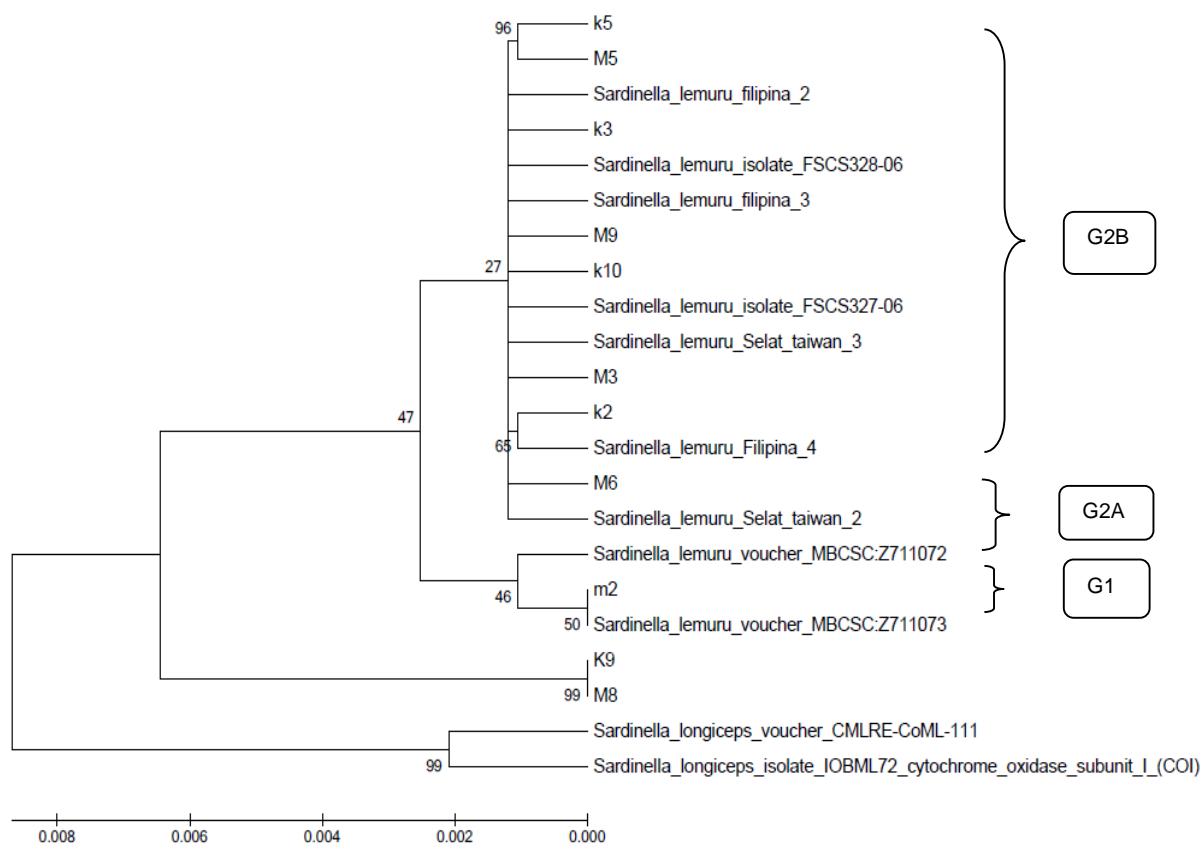
Tabel 2. Matriks Probabilitas Substitusi Nukleotida Spesies *Sardinella lemuru*

	A	T	C	G
A	-	2.58	2.7	12.47
T	1.92	-	28.1	1.6
C	1.92	26.85	-	1.6
G	14.98	2.58	2.7	-

Berdasarkan analisis yang telah dilakukan diketahui bahwa nilai similaritas dan jarak genetik bervariasi pada kesebelas sampel yang dianalisis (Tabel 3). Sementara hasil analisis jarak genetik skuen ikan lemuru dari gen COI menunjukkan bahwa jarak genetik terdekat adalah 0,0%, yaitu sampel K3, M3, M6, Filipina 2 dan Taiwan 2 dengan memiliki nilai similaritas sebesar 100%. Serta sampel K9 dan M8 memiliki nilai similaritas 100 %. sampel M2 memiliki nilai similaritas 100 % dengan *Sardinella lemuru* MBCSC. Hasil analisa didapatkan Jarak genetic terjauh diantara skuen *Sardinella lemuru* di perairan Selat Bali sebesar 1,9 % yaitu pada sampel K5 dengan M8 dengan nilai similaritas keduanya yaitu 98,1 %. Dari hasil dapat diketahui bahwa ada 27% dari 11 sekuen sampel *Sardinella lemuru* di perairan Selat Bali mempunyai kemiripan 100% dengan *Sardinella lemuru* Filipina 2 dan Taiwan 2. Sebanyak 9% sekuen lemuru mempunyai kemiripan 100% dengan sekuen *Sardinella lemuru* MBCSC. Nilai similaritas sebesar 100% menunjukkan bahwa spesies ikan lemuru di Selat Bali merupakan spesies ikan lemuru yang sama dengan ikan lemuru yang terdapat di Filipina dan selat Taiwan. Sofro (1994) menyatakan bahwa suatu populasi yang memiliki tingkat kedekatan hubungan kekerabatan yang tinggi mempunyai banyak persamaan morfologi, genetik dan dipengaruhi oleh keadaan lingkungan

Pohon filogenetik merupakan suatu metode untuk mengetahui tingkat evolusi dan kekerabatan suatu spesies. Spesies *Sardinella lemuru* yang memiliki rantai DNA yang mirip akan membentuk suatu cabang yang berdekatan dan akan membentuk satu kelompok yang besar (clade). Analisis filogenetik suatu spesies dapat dilakukan pada karakter morfologi dan gen-gen yang berada di dalam dan di luar tubuh dengan sekuen DNA mitokondria. Penggunaan

sekuen DNA mitokondria memperjelas hubungan spesies secara evolusi yang kabur akibat variasi morfologi (Avise, 1994). Sekuen DNA mitokondria memperlihatkan variasi DNA suatu populasi, perubahan breeding suatu individu dan isolasi terhadap populasi tersebut (Liu et al., 2000; Tjong et al., 2007). Setelah dibandingkan antara 11 sekuen gen COI *Sardinella lemuru* di perairan Selat Bali dengan 7 sekuen gen COI *Sardinella lemuru* dan *Sardinella longiceps* dari Gen Bank menghasilkan pohon filogeni pada Gambar 2 yang dibuat dari program MEGA 5.2 berdasarkan algoritma neighbor joining tress dengan model evolusi Kimura-2parameter (K2P). Hasil konstruksi pohon filogeni menunjukkan bahwa 11 sekuen gen COI lemuru dari perairan Selat Bali tidak berkelompok sesuai dengan daerah pendaratannya masing-masing, akan tetapi bercampur menjadi dua sub clad besar. Terdapat dua grup (clade) besar ikan Lemuru yaitu G1 dan G2, pada clade G2 terbagi menjadi 2 sub clad lagi yaitu sub clad G2A dan Sub clad G2B. Dari pohon filogeni diketahui 11 sekuen gen COI *Sardinella lemuru* dari Selat Bali juga berkelompok menjadi satu sub clad besar dengan gen COI *S. lemuru* yang berasal dari China, Filipina, dan Selat Taiwan. Sedangkan subclad lainnya mengelompok hanya dengan lemuru yang terdapat di perairan Selat Bali yang kemungkinan besar merupakan berasal dari populasi yang sama. Hasil ini menunjukkan bahwa ikan lemuru yang berada di perairan Selat Bali merupakan dari jenis *Sardinella lemuru* dengan nilai jarak genetik <0.019. Skuen *Sardinella longiceps* yang digunakan sebagai outgroup membentuk subklad yang berbeda dengan sampel *S. lemuru* dengan jarak genetik ≥ 0.019 . Hal ini sesuai dengan pernyataan Hebert (2003) bahwa jarak genetik berdasarkan sekuen gen COI lebih dari 0.02 merupakan spesies yang berbeda.

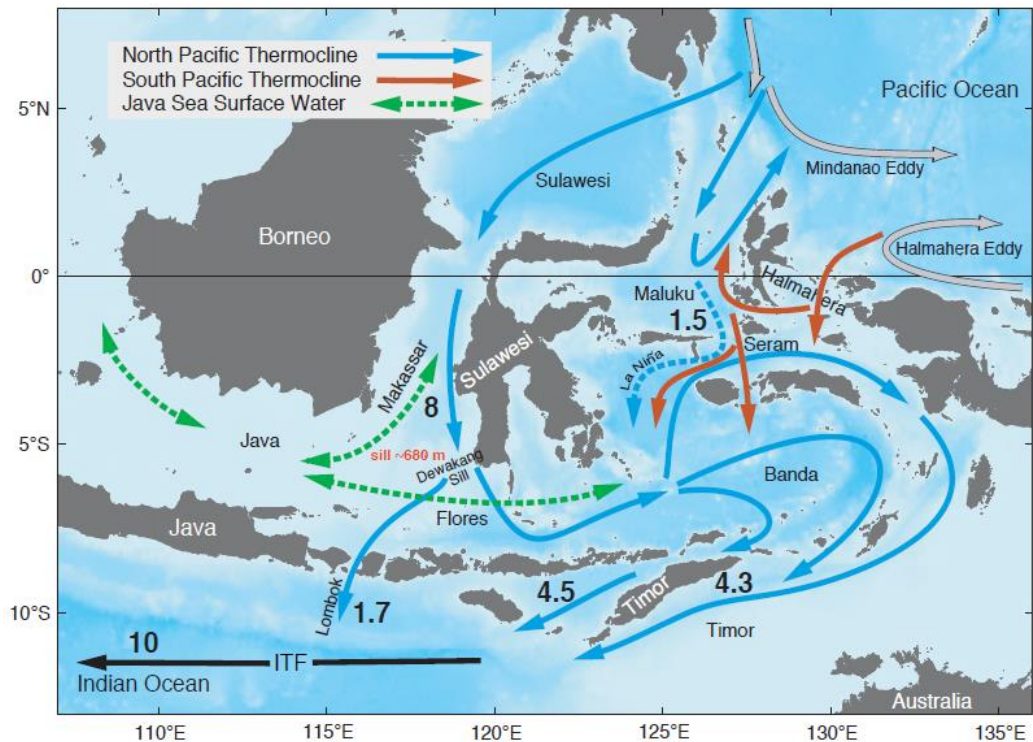


Gambar 3. Pohon Filogeni *Sardinella lemuru*. Menggunakan Sekuen Gen COI. Konstruksi Pohon Filogeni Berdasarkan Algoritma *Neighbour Joining Tree* Dengan Model Evolusi K2P (Bootstrap 1000x Pengulangan).

Pada clade *Sardinella lemuru* membentuk beberapa kelompok percabangan yang mengindikasikan bahwa terdapat populasi yang berbeda pada clade *Sardinella lemuru*. Skuen M2 terlihat berada di luar percabangan yang mengindikasikan individu ini berasal dari populasi yang berbeda dengan yang lainnya. Skuen K5 dan M5 berada pada satu cabang yang sama dan berdekatan, yang menunjukkan kedua individu ini memiliki kekerabatan yang sangat dekat. Pada skuen K9 dan M8 terlihat berada pada percabangan berbeda pada clade *Sardinella lemuru* lainnya yang menunjukkan individu ini memiliki jarak genetik terjauh dengan yang lainnya.

Kekerabatan genetik yang dekat antara ikan lemuru di perairan selat bali dengan ikan lemuru yang terdapat di perairan filipina, laut china selatan, laut china dan selat Taiwan salah satu penyebab persebaran lemuru

sendiri diduga dipengaruhi oleh adanya Arus lintas Indonesia (ARLINDO). Arlindo adalah aliran massa air yang membentuk arus laut pada wilayah perairan Indonesia dari Utara yang berasal dari Samudera Pasifik, menuju ke Selatan ke Samudera Hindia (Rizal, 2015) (Gambar 4). Faktor ini yang mengakibatkan terjadinya percampuran genetic antara ikan lemuru diperairan selat bali dengan ikan lemuru didaerah lain, karena ikan lemuru mengikuti arus arlindo untuk mencari makanan. Ini sesuai dengan pernyataan Tomascik *et al.*, (1997), Ketika melewati perairan Indonesia, maka massa air Arlindo akan bercampur dengan massa air lainnya, sehingga terjadi percampuran massa air dari dua Samudera yang berbeda. Sebagai salah satu jalur arlindo, perairan ini kaya akan nutrisi penting bagi kehidupan fitoplankton. Dalam rantai makanan, fitoplankton akan dimakan ikan kecil dan kemudian oleh ikan besar.



Gambar 4. Arus Lintas Indonesia (ARLINDO) (Gordon, 2005)

KESIMPULAN

Hasil analisis genetik mitokondria 11 skuena yang diperoleh dari Muncar Banyuwangi dan Kedonganan, Badung, teridentifikasi sebagai *Sardinella lemuru* berdasarkan Gen COI, dengan panjang amplicon sebesar 650 bp. Berdasarkan analisis gen COI Variasi genetik *Sardinella lemuru* di perairan Selat Bali masih tergolong tinggi. *Sardinella lemuru* di perairan Selat Bali memiliki hubungan kekerabatan genetik yang dekat dengan *Sardinella lemuru* yang terdapat di perairan Laut Cina Selatan, Selat Taiwan, Filipina dan Cina. Kedekatan secara genetik, ini diduga akibat pengaruh dari Arus Lintas Indonesia (ARLINDO).

TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada segenap staf dan peneliti di Laboratorium Biomolekuler fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang, kelompok nelayan di Muncar, Banyuwangi dan Kedonganan, Bali yang telah membantu dalam mengumpulkan sampel ikan lemuru yang digunakan

DAFTAR PUSTAKA

- Ausubell, F. M, Brent, R., Kingston, R. E., Moore, P.D., Seidemen, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (2002). *Short Protocols in Molecular Biology, Fifth Edition*. John Wiley and Son Inc. Canada
- Avise, J. C. (1994). *Molecular Marker, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall. USA
- Buhay, E. (2009). "COI-Like" Sequences Are Becoming Problematic In Molecular Systematic And DNA Barcoding Studies. University Of South Carolina
- Costa, F. O., de Waard, J. R., Boutillier, J., Ratnasingham, S., Dooh, R. T., Hajibabei, M., & Hebert. P. D. N. (2007). Biological Identifications through DNA Barcodes: The Case of Crustacea. *Canadian J. Fish. & Aqua. Sci.*, 64(2), 272-295. doi: 10.1139/f07-008
- Divya, P., Gopalakrisna, A., Jhon, L., Thomas, P.C., & Cakra, W. S. (2009). Mitochondrial DNA (Cythochrome C Oxidase I) Sequencing of Indian Marine

- Mussels. *Indian J. Fish.*, 56(3), 223-226.
- Dunham, R. A. (2002). *Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approach*. New York: CABI Publishing, Cambridge. pp 85-99
- Gordon, L. (2005). Oceanography of the Indonesian Seas and Their Through flow. *Oceanography*, 18(4).
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Shelley, L., & de Waard, J. R. (2003). Biological Identifications Through DNA Barcodes. *Proc. R. Soc. Lond.*, 270.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & de Ward, J. R. (2003). Barcoding Animal Life Cytochrome C Oxidase Divergences Among Closely Related Species. *Proc. R. Soc. Lond.*, 270.
- Jonas, P. Q., Brian, S., Santos, P., Ong., Zubaida, U., Basiao., Ian Kendrick, C., Fontanilla, & Cao, E. P. (2011). DNA Barcoding of the Philippine Endemic Freshwater Sardine *Sardinella tawilis* (Clupeiformes: Clupeidae) and Its Marine Relatives. *Philipp. Agric. Scientist*, 94(3), 248-257.
- Liu, W., Lathrop, A., Fu, J., Yang, D., & Murphy, R. W. (2000). Phylogeny of East Asian Bufonids Inferred from Mitochondrial DNA Sequences (Anura: Amphibia). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14(3), 423-435.
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Noor, R. (2008). *Genetika Ekologi*. Laboratorium Genetika Ternak. Institut Pertanian Bogor
- Rizal, F., Setiyo, W., Pratomo, Y., dan Andri, E. (2015). Identifikasi Komponen Harmonik Di Selat Lombok Berdasarkan Data Arus Time Series. *Depik*, 4(1), 24-32.
- Sofro, A. S. M. (1994). *Keanekaragaman Genetik*. Yogyakarta: Andi Offset. 127 hal
- Susilo, K. (2015). Variabilitas Faktor Lingkungan Pada Habitat Ikan Lemuru Di Selat Bali Menggunakan Data Satelit Oseanografi Dan Pengukuran Insitu.
- Tjong, D. H., Matseu, M., Kuramoto, M., Belabut, D. M., Sen, Y. H., Nishioka, M., & Sumida, M. (2007). Morphological Divergence, Reproductive Isolating Mechanism and Molecular Phylogenetic Relationship, Among Indonesia, Malaysia, and Japan Populations of the *Fejervaria limnocharis* Complex (Anura, Ranidae). *Zoological Science*, 24, 1197- 1212.
- Tubaro, P., & Lijtmaer, D. A. (2002). Hybridization Patterns and The Evolution of Reproductive Isolation in Ducks. División Ornitología, Museo Argentino de Ciencias Naturales 'Bernardino Rivadavia' Buenos Aires, Argentina. *Biological Journal of the Linnean Society*, 197-200
- Tomascik, T., Mah, A. J., Nontji, A., Moosa, M. K. (1997). *The ecology of Indonesian seas*. Part I, Periplus Editions Ltd., Singapore
- Wijana, I. M. S., & Mahardika, I. G. N. (2010). Struktur Genetik Dan Filogeni Tuna Sirip Kuning (*Thunnus albacares*) Berdasarkan Sekuen DNA Mitochondria Control Region Sitokrom Oksidase I Pada Diversitas Zone Biogeografi. *Jurnal Bumi Lestari*, 10(2): 270 – 274.
- Zhang, J. (2011). Species Identification of Marine Fishes in China with DNA Barcoding. Evidence-Based Complementary and Alternative. *Medicine*, Article ID 978253, 10 pages.